

**WEST****B1****End of Result Set;****Generate Collection**

L3: Entry 1 of 1

File: DWPI

Jun 25, 1986

DERWENT-ACC-NO: 1986-279143

DERWENT-WEEK: 198643

COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prepn. of microbial secondary metabolites - using Streptomyces and increasing yield by adding e.g. sodium tetra:borate or sodium molybdate to inhibit extracellular phosphatase

INVENTOR: BOCKER, H; MULLER, P J ; OZEGOWSKI, J H

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

AKAD WISSENSCHAFTEN DDR

DEAK

PRIORITY-DATA:

1985DD-0276024

May 6, 1985

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
DD 236944 A	June 25, 1986	N/A	004	N/A

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
DD 236944A	May 6, 1985	1985DD-0276024	N/A

INT-CL (IPC): C12P 1/06; C12P 19/28

ABSTRACTED-PUB-NO: DD 236944A

BASIC-ABSTRACT:

The prepn. of microbial secondary metabolites in submerge fermentation in a medium contg. C, N and mineral salts and in the presence of a phosphate-contg. organic substrate in aerated cultures using Streptomyces tes pref. Streptomyces hygroscopicus which form Turimycin or Streptomyces noursei which forms Nourseothricin as the Microbial producer, and adding inhibitors of the extracellular phosphatase (e.g. sodium tetraborase or sodium molybdate) in concns. up to 10 mM before sterilisati on and/or after sterilisation and/or during fermentation.

USE - The concentration of secondary metabolites in the microbial fermentation is increased. The invention is of use in the microbiological and pharmaceutical industry.

ABSTRACTED-PUB-NO: DD 236944A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B02-N; B02-T; D05-C02; D05-H01;

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

## PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 236 944 A1

4(51) C 12 P 19/28  
C 12 P 1/06

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 276 024 8

(22) 08.05.85

(44) 25.06.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Müller, Peter J., Dr. rer. nat.; Ozegowski, Jörg-Hermann, Dr. rer. nat.; Bocker, Harald, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von mikrobiellen Sekundärmetaboliten

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von mikrobiellen Sekundärmetaboliten mit Streptomyceten als mikrobielle Produzenten offenbart. Erfindungsgemäß werden den Kulturansätzen vor und/oder nach der Sterilisation Effektoren zugesetzt, die als Inhibitoren der durch die Mikroorganismen in das Kulturmedium exkretierten sauren Phosphatase wirken. Solche Inhibitoren sind beispielsweise lösliche Borate, Molybdate, Vanadate und Arsenate. Durch den Zusatz solcher Inhibitoren wird die Phosphataseaktivität der Kulturen auf einen für die jeweilige Biosynthese günstigen Wert eingestellt.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

**Erfindungsanspruch:**

Verfahren zur Herstellung von mikrobiellen Sekundärmetaboliten in Submersfermentationen in einem Kohlenstoff, Stickstoff und Mineralsalze enthaltenden Medium bei gleichzeitiger Anwesenheit von phosphathaltigen organischen Substraten in belüfteten Kulturen, gekennzeichnet dadurch, daß Streptomyceten, vorzugsweise der Turimycinbildner *Streptomyces hygroscopicus* oder der Nourseothricinbildner, *Streptomyces noursei*, als mikrobielle Produzenten verwendet werden und vor der Sterilisation und/oder nach der Sterilisation und/oder während der Fermentation Inhibitoren der extrazellulären Phosphatase, beispielsweise Natriumtetraborat oder Natriummolybdat, in Konzentrationen bis 10 mM zugesetzt werden.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur effektiven Herstellung von Sekundärmetaboliten durch mikrobielle Fermentation. Die Erfindung ist in der mikrobiologischen und pharmazeutischen Industrie anwendbar.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

Es ist bekannt, daß die Effektivität von mikrobiellen Sekundärmetabolit-Fermentationen durch den Zusatz von bestimmten Substanzen, sogenannte Effektoren, zu den Submerskulturen erhöht werden kann. Effektoren sind dadurch charakterisiert, daß ihr Vorliegen nicht Voraussetzung für das Wachstum der mikrobiellen Produzenten ist. Die meisten die Sekundärmetabolitbildung positiv beeinflussenden Substanzen wurden durch empirische Untersuchungen gefunden. Es existieren keine Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus, und sie sind nicht wirkungsspezifisch klassifiziert. Bekannt ist beispielsweise, daß der Zusatz von Dichromat zu Fermentationen des Makrolidantibiotikums Turimycin die Ausbeute auf 150% steigert (WP 84896, 5. 10. 1970). Ebenso wurde gefunden, daß die Actinomycin-Biosynthese durch den Zusatz von Orthovanadat auf 379% gesteigert werden kann (WP 30H 141951, 5. 10. 1970). Das Patent AP-A 61 K/223321 14. 8. 1980 beansprucht den Schutz verschiedener Effektoren des Aminosäuretransports beziehungsweise der Atmung, z. B.  $Zn^{++}$ -Ionen, die bei Zusatz zu Kulturen von *Streptomyces noursei* JA 3890b die Bildung des Streptothricin-Antibiotikums Nourseothricin stark stimuliert. Bestimmte schwerlösliche Verbindungen z. B. Magnesiumphosphat und verwandten Verbindungen zeigen stimulierenden Einfluß auf die Leucomycin-Biosynthese (Omura, S.; Tanaka, Y., Takahashi, Y., Iwai, Y. and C. Kitao: Stimulation of Leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation, 1980. In: Advances in Biotechnology, Fermentation Products. Vol. III Edt. M. Moo-Young, C. Vezina and K. Singh. Pergamon Press 1981, p. 181-186). Die Tylosin-Produktion wird durch Zusatz von Eisenammoniumcitrat gefördert (K. Vu-Trong, P. P.; Gray, A.: Stimulation of Tylosin productivity resulting from cyclic feeding profiles in fed batch cultures, Biotechnol. Lett. 4, 11, 1982, 725-728). Die fördernde Rolle von Spurenelementen wird in einer großen Zahl von Publikationen beschrieben. (Übersicht in Weinberg, D.: Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. Folia microbiol. 23, 1978, 496-504).

**Ziel der Erfindung**

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, die Konzentration an Sekundärmetaboliten in mikrobiellen Fermentationen zu erhöhen.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem höhere Ausbeuten bei Sekundärmetabolitfermentationen mit Streptomyceten als produzierende Mikroorganismen erhalten werden können. So wurde überraschend gefunden, daß der Zusatz von Natriumtetraborat die Effektivität von Sekundärmetabolit-Fermentationen, beispielsweise von Turimycin mit *Streptomyces hygroscopicus* oder von Nourseothricin mit *Streptomyces noursei* JA 3890b, stimuliert. Weiter wurde gefunden, daß Substanzen, die Molybdat, Vanadat und/oder Arsenat als Anionen enthalten, eine ähnliche fördernde Wirkung auf die Biosynthese der genannten Antibiotika ausüben. Es wurde außerdem gefunden, daß Borate, Molybdate, Vanadate und Arsenate Inhibitoren der extrazellulären sauren Phosphatase, die von den genannten Streptomyceten excretiert wird, darstellen. Es wird der Schluß gezogen, daß die stimulierende Wirkung auf der Eigenschaft dieser Substanzen, die saure Phosphatase zu inhibieren, zurückzuführen ist. Bei diesem Verfahren werden dem Medium von Sekundärmetabolit-Fermentationen Inhibitoren von saurer Phosphatase, die durch ein Aktivitätsmaximum im Bereich von pH 5,0 bis 7,0 charakterisiert ist, beispielsweise Molybdate, Vanadate, Arsenate oder Borate, zugesetzt. Die Zugabe kann auch nach der Sterilisation oder während der Fermentation erfolgen. Die Konzentration der Inhibitoren bis 10 mM liegt somit bis zu 100fach höher als die Inhibitor-Konzentration, die eine Erniedrigung der Phosphataseaktivität des Kulturfiltrats auf die halbe Aktivität bewirkt. Die Fermentation erfolgt in an sich bekannter Weise in einem Medium, das Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, Mineralsalze und organisch gebundenes Phosphat enthält bei Temperaturen von 25 bis 32°C und pH-Werten zwischen 5,0 bis 8,0 und ausreichender Sauerstoffversorgung. Vorteilhaft ist, daß über die Konzentration der eingesetzten Phosphataseinhibitoren die Aktivität der sauren Phosphatasen durch geeignete Wahl der Konzentration auf einen für die Sekundärmetabolit-Biosynthese optimalen Wert eingestellt werden kann.

Der Einsatz der Inhibitoren erlaubt es außerdem, die Konzentration der komplexen phosphathaltigen Substrate im Medium beispielsweise Sojaschrot, Erdnußschrot und Kartoffelstärke, zu erhöhen und damit den fördernden Effekt der anderen Inhaltsstoffe des komplexen Substrates für die Biosynthese ohne die nachteiligen Folgen zu hoher Phosphataseaktivität zu realisieren.

#### Ausführungsbeispiele

1. Die Anzucht des Turimycin-Bildners *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599-/R27-158 erfolgt submers unter aeroben Bedingungen in einem Vorzuchtmedium folgender Zusammensetzung pro Liter: Glucose 15g, Maisquellwasser (bezogen auf Trockensubstanz) 10g, Backhefe 5g und Calciumcarbonat 4g, Leitungswasser ad 1000ml; Azidität vor der Sterilisation: pH 7,2. Mit dem so erhaltenen Inokulum wird das Fermentationsmedium für die Hauptkultur beimpft, das in einem Liter enthält: Kartoffelstärke 40g, Glucose 7g, Melasse 5g,  $\text{KNO}_3$  1g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3,5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5g, Maisquellwasser (bezogen auf Trockensubstanz) 3g, Trockenhefe 1g, Sojamehl, entölt 5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,7g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,02g, Sonnenblumenöl 3g,  $\text{CaCO}_3$  4g, Leitungswasser ad 1000ml. Vor dem Sterilisieren im Autoklaven (30 Minuten bei 121°C) wird den einzelnen Medien-Partien abgestufte Mengen an  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt, bis die in der Tabelle 1 angegebenen Borat-Konzentrationen im Medium erreicht werden. Vor der Beimpfung wird die Azidität des Fermentationsmediums auf den Wert pH 6,0 eingestellt. Die Fermentation erfolgt in Schüttelkulturen bei 26 bis 28°C. Die in der Tabelle 1 angegebenen Turimycin-Konzentrationen sind arithmetische Mittelwerte aus jeweils vier Parallelansätzen.  
Die Bestimmung des Turimycins erfolgt mit einem Lochplattendiffusionstest mit *Bacillus subtilis* AtCC 6633 als Testkeim.
2. Der eingesetzte Turimycin-Bildner, seine Kultivierung und die Versuchsanstellung sind die gleichen wie im Beispiel 1 angegeben bis auf den Zusatz von  $\text{Na}_3\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  anstelle von  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Die in der Tabelle 2 angegebenen Turimycin-Konzentrationen sind arithmetische Mittelwerte aus jeweils vier Parallelversuchen.
3. Die Anzucht des Nourseothricin-Bildners *Streptomyces noursei* JA 3890b-// BF 32 erfolgt submers unter aeroben Bedingungen in einem Vorzuchtmedium folgender Zusammensetzung pro Liter: Glucose 15g, Sojamehl, entölt 15g,  $\text{NaCl}$  5g,  $\text{CaCO}_3$  1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3g, Leitungswasser ad 1000ml; Azidität vor der Sterilisation pH 6,5. Mit dem so erhaltenen Inokulum wird das Fermentationsmedium für die Hauptkultur beimpft, das in 1 Liter enthält: Kartoffelstärke 32g, Glucose 29g, Sojamehl 14g, Ammoniumnitrat 7g, Magnesiumsulfat 2g,  $\text{CaCO}_3$  6g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5g, Leitungswasser ad 1000ml. Vor dem Sterilisieren im Autoklaven (30 Minuten bei 121°C) werden den einzelnen Medienpartien abgestufte Mengen an  $\text{Na}_3\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt, bis die in der Tabelle 3 angegebenen Molybdat-Konzentrationen im Medium erreicht werden. Die Fermentation erfolgte in Schüttelkulturen bei 26 bis 28°C. Die in der Tabelle 3 angegebenen Nourseothricin-Konzentrationen sind arithmetische Mittelwerte aus jeweils 4 Parallelansätzen.  
Die Bestimmung des Nourseothricins erfolgt mittels eines Lochplattendiffusionstestes mit *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Testkeim.